Контактная информации об авторах для переписки
Овчаренко Татьяна Михайловна - к.в.н, старший преподаватель кафедры внутренних незаразных болезней, патофизиологии, клинической диагностики, фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВПО «Донской государственный аграрный университет», ул. Мичурина, д. 23, кв. 18, п. Персиановский, Октябрьский р-он, Ростовская обл., 346493. тел. 89281449155. E -mail: phsicheya@mail.ru
Дерезина Татьяна Николаевна - д.в.н, профессор, заведующая кафедрой внутренних незаразных болезней, патофизиологии, клинической диагностики, фармакологии и токсикологии, ФГБОУ ВПО «Донской государственный аграрный университет», ул. Мичурина 33, Персиановский, Октябрьский р-он, Ростовская обл., 346493. тел. (86360) 36139 (раб), 89034351237 (моб). E-mail: derezinasovet@mail.ru.
Ермаков Алексей Михайлович - ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, 346421, Ростовское шоссе 0, г. Новочеркасск.

УДК 616-07.616.9.619.

Красникова Е.С., Агольцов В.А., Мелкина П.С.
(Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова)

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА РЕТРОВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: вирусный иммунодефицит, лейкемия, крупный рогатый скот, полимеразная цепная реакция, реакция иммунодиффузии.

В царстве Vira семейство Retroviridae занимает особое место. Обусловлено это не только уникальными биологическими свойствами и структурой, но и тем, что в подавляющем большинстве случаев ретровирусы не вызывают быстрой гибели клеток хозяина, являясь причиной хронических неизлечимых заболеваний, имеющих тенденцию к широкому распространению [1, 6].

Среди многочисленных представителей этого семейства в особую группу выделяют вирусы, вызывающие лейкозы и иммунодефициты, в частности у крупного рогатого скота. Данные возбудители имеют филогенетическое родство с подобными заболеваниями у людей. Вирусы лейкоза крупного рогатого скота (BLV) и Т-клеточного лейкоза человека, также как вирус иммунодефицита КРС (BIV) и HIV1 имеют высокую степень гомологии генетического материала [6, 8]. В молоке и мясе больных животных содержатся вирусы [2, 16]. Известно, что ретровирусы способны преодолевать межвидовой барьер, в том числе и осуществлять переход с животных на человека [6]. В экспериментальных условиях к ВЛ КРС оказались чувствительны овцы, кролики, свиньи и обезьяны. А среди овец известны случаи вирусоносительства в естественных условиях. [2].

Среди исследователей нет однозначного мнения о безопасности продуктов питания, полученных от животных инфицированных вирусами лейкоза и иммунодефицита. С одной стороны, эти вирусы считаются видоспецифичными [1, 6]. С другой, сырое молоко от лейкозных коров не допускается к питанию людей, а для детей не допускается к питанию в любом виде [4]. Более того, установлено, что продукция, полученная от больных животных содержат метаболиты циклических аминокислот, в том числе триптофана, являющихся

опасными для здоровья человека [2].

По данным исследователей, эти инфекции широко распространены по всему миру. Вирус бычьего иммунодефицита регистрируют в Японии (6,4-18,7%), Франции (2%), Канаде (5,5-23,4%), Иране (20,3%), Аргентине (2-42%), Германии (6,6%), Нидерландах (1,4%), Италии (2,5%), Бразилии (11,7%), Турции (12,3%), Южной Корее (33%), США (более 50%), а также в Польше, Камбоджи, Пакистане, Австралии [9, 11, 13, 14, 19, 20]. На территории Российской Федерации подобные исследования эпизодичны. По некоторым свидетельствам, инфицированность крупного рогатого скота вирусным иммунодефицитом в Московской области составляет от 11 до 67%, а в Ставропольском крае 11-33% [3, 8].

Серо-эпидемиологические исследования показали, что вирус бычьей лейкемии широко распространен на всех континентах. В Восточной Европе эта болезнь присутствует в Болгарии, Хорватии, Эстонии, Латвии, Польше, Румынии, Украине [17]. BLV регистрируют в Канаде (до 89%), в Южной Америке (34-50%), в Аргентине (32,8-84%), в Бразилии (более 50%), в Турции и Иране (48,3-64,7%), в Японии (28,6%-68,1%), в Корее (до 86,8%), в Камбодже и на Тайване (около 5%) [9, 10, 12, 13, 14, 15, 21, 22, 23, 24].

В настоящее время, согласно официально утвержденным правилам, противоэпизоотические мероприятия в отношении лейкоза КРС базируются на выявлении и изъятии из стада животных, инфицированных BLV. При этом регламентированными являются реакция иммунодиффузии (РИД) и гематологические исследования [5]. В то же время, по данным многих исследователей, РИД и гематологические исследования не являются абсолютными методами прижизненной диагностики гемобластозов КРС [3, 7, 11]. Для диагностики вирусного иммунодефицита КРС в РФ не существует сертифицированных тест-систем и официально утвержденных инструкций.

Производители предлагают ряд различных тест-систем для выявления как самих агентов, так и специфичных антител к ним: иммунофементный анализ (ELISA), реакция иммунофлуоресценции, вестерн-блот, полимеразная цепная реакция в различных модификациях (классическая PCR, Real-time PCR, OT-PCR, Nested PCR). В литературе имеются данные о высокой чувствительности, специфичности и информативности современного метода молекулярно-генетической диагностики – (ПЦР) [3, 7, 16, 18].

Таким образом, проблематика вирусных иммунодефицитов и гемобластозов животных является весьма актуальной на данный момент. В то же время имеется много «белых пятен» в этой области. В частности требует внимания поиск новых, современных путей эффективного и своевременного выявления инфицированных животных.

Целью данных исследований явилось выяснение в сравнительном аспекте диагностической ценности классического серологического метода (РИД) и полимеразной цепной реакции при индикации ретровирусных инфекций КРС, а также корреляционной связи между носительством у животных вирусов иммунодефицита и лейкоза в Саратовской области.

Для достижения цели нами были поставлены следующие задачи:

- выяснить уровень инфицирования КРС находящегося в разной форме собственности вирусами иммунодефицита и лейкоза;
- изучить клинико - эпизоотические особенности вирусного иммунодефицита КРС;
- установить степень микстинфицирования животных обоими ретровирусами;
- дать сравнительную оценку диагностических возможностей РИД и ПЦР при лабораторной диагностике ретровирусных инфекций животных;
- определить возможности ПЦР для выявления провирусов в молоке и различных фракциях крови от инфицированных животных.

Материалы и методы

Материалом для исследования явились 271 проба крови и 271 проба молока, от коров, принадлежащих ООО «Ягоднополянское» Татищевского района», 40 проб крови от крупного рогатого скота ФГОУ СПО «Краснокутский зооветеринарный техникум», а также 299 проб крови от КРС в возрасте 3-10 лет находящегося в частной собственности жителей Саратовского и Духовницкого районов. Для сравнительного анализа и были использованы статистические данные ОГУ «Татищевская районная ветеринарная лаборатория СББЖ» Саратовской области.

Исследование материала от крупного рогатого скота на носительство вируса лейкоза и иммунодефицита осуществляли методом ПЦР на оборудовании фирмы «Биоком» (Россия). Выделение и очистку ДНК из исследуемого материала проводи-

ли методом нуклеосорбции на селикогеле с применением набора ДНК-сорб-В (Россия) согласно прилагаемой к набору инструкции. При исследовании на энзоотический лейкоз КРС, для выявления провирусной ДНК использовали набор «Лейкоз» производства ИнтерЛабСервис (Россия). Носительство бычьего вируса иммунодефицита определяли с использованием набора ПЦР-Микс и буфера для нанесения (НПФ «Литех», Россия) с добавлением праймеров gag и pol (синтез ЗАО «Синтол», Россия) к соответствующим последовательностям генома вируса. Олигонуклеотидные последовательности были подобраны на основании исследований Колотвина В.В. [4]. Праймеры: gag 1 (5'-GTCTT CCCACATCCGTAACATCTCCT-3'), gag 2 (5'-CCCCAGGTCCCATCAACATTCATC AG-3'), pol 1 (5'-CCAGGAATTAAGGAA TGTGAACACTTAACT-3') и pol 2(5'-CA TCCTTGTGGTAGAACATTCCACTG-3'). Условия амплификации были адаптированы нами для AMPLY-4: начальная инкубация 95ºС 2 мин.; денитурация 95ºС 1 мин., отжиг 58ºС 1 мин, элонгация 72ºС 1 мин. – 45 циклов; терминальная инкубация 72ºС 2 мин. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/л этидия бромида при стандартных условиях с фоторегистрацией полученных результатов.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате обследования 299 голов крупного рогатого скота, находящегося в частном владении было установлено, что носителями BIV являются 37 животных (12,37%). Наиболее часто инфицированные животные встречались среди КРС в возрасте 5-10 лет (20 голов,54,07%), реже – 6 месяцев – 1,5 лет (7 голов, 18,91%) и 1,5 – 5 лет (6 голов, 16,21%), в меньшей степени были заражены телята в возрасте 3-6 месяцев (4 головы, 10,81%). Результаты исследований представлены на рис.1 и 2.

При этом у 29,72% животных (11 голов) наблюдались клинические симптомы, характерные для иммунодефицитного состояния, тогда как по результатам обследования проведенных в областной лабо-

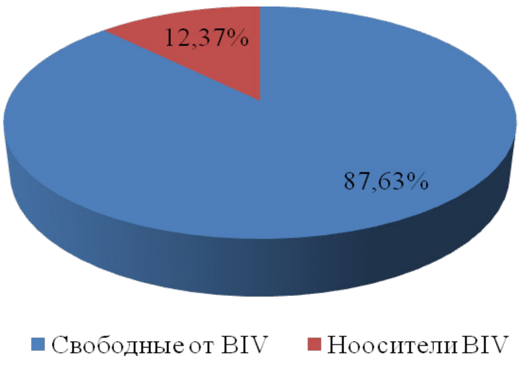

Рис. 1. Результаты обследования КРС при подворном содержании на носительство BIV.

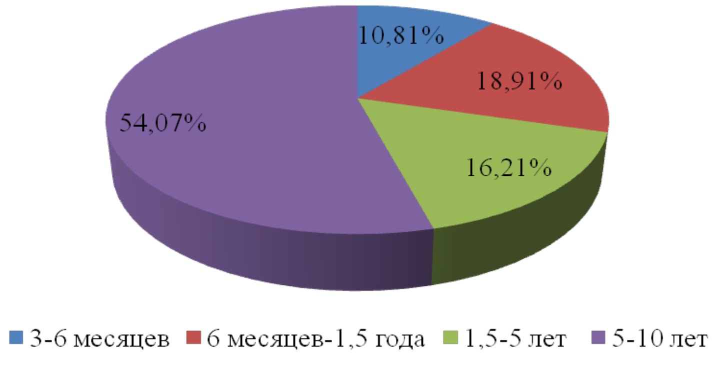

Рис. 2. Возрастная принадлежность BIV-инфицированных животных.

ратории они не были признаны носителями вируса лейкоза. Наиболее часто у BIV-инфицированных животных регистрировали маститы, метриты и задержание последа, респираторные синдромы и дисфункции желудочно-кишечного тракта, а также регионарные лимфадениты. Следует отметить, что в большинстве случаев наблюдалось сочетанное развитие симптомов, а и клинические проявления носили рецидивирующий характер.

Наши данные коррелируют с результатами исследований ряда авторов, показывающими тенденцию к более частому распространению вирусного иммунодефицита среди животных старше 5 летнего возраста. А также к выявлению у них подобного рода неспецифических клинических признаков иммунодефицитного состояния, проявляющихся развитием рецидивирующих хронических вторичных инфекций [8, 12, 17, 19, 22, 24].

Следующим этапом нашей работы стало исследование крови от молочных коров черно-пестрой и голштинофризской пород принадлежащих двум независимым фермерским хозяйствам и находящихся на стойловом содержании. Результаты исследования 311 проб крови от КРС методом ПЦР на носительство провирусов иммунодефицита и лейкоза представлены на рис.3. Как показано на рисунке, выявление, и вирусного иммунодефицита и лейкоза КРС в отдельно взятых хозяйствах Саратовской области, по нашим данным, довольно высокий: 68,7% и 65,2% соответственно. Кроме того, в 52,5% случаев наблюдалось сочетанное инфицирование ретровирусами.

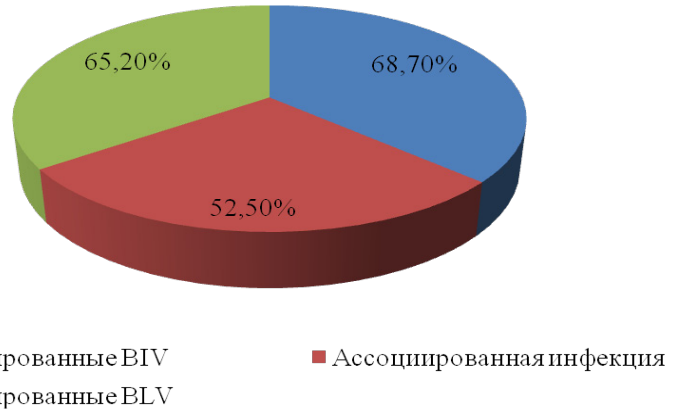

Рис. 3. Результаты обследования КРС на носительство вирусов иммунодефицита и лейкоза.

Полученный результат может объясняться тем, что исследования проводились в неблагополучных стадах, где на протяжении нескольких лет были больные лейкозом животные. Кроме того, коровы постоянно находились на совместном стойловом содержании. Наши данные коррелируют с результатами других исследователей, показывая высокий уровень носительства вирусных иммунодефицитов и лейкозов среди молочного скота, а также значительную степень микстинфицирования животных обоими ретровирусами одновременно [3, 8, 9, 13, 14].

При сравнении результатов исследования крови КРС, находящегося в индивидуальном владении и принадлежащего фермерским хозяйствам, можно констатировать, что BIV встречается в фермерских хозяйствах в 5,55 раз чаще. Это может быть связано с более тесным контактом фермерского скота между собой, возможностью ятрогенного распространения инфекции при проведении лечебно-профилактических и диагностических мероприятиях, предрасположенностью высокопродуктивных животных к заболеванию и рядом других факторов, обусловленным особенностями приобретения, кормления и содержания животных. При анализе данных ряда авторов также можно видеть тенденцию более широкого распространения вирусных иммунодефицитов в фермерских хозяйствах не зависимо от территориального расположения стад и породной принадлежности животных [9, 11, 13, 14, 19, 20].

Дальнейшим этапом наших исследований явилось сравнение эффективно-

сти классического серологического метода (РИД) и современного молекулярно-генетического метода (ПЦР) при выявлении КРС инфицированного вирусом лейкоза. Для этого методами РИД и ПЦР параллельно были изучены 271 проба крови КРС. Полученные нами данные отражены на рис. 4. Из рисунка следует, что в РИД с сывороткой крови от КРС, положительные результаты (наличие противолейкозных антител) были отмечены в 16% проб. Методом ПЦР наличие провирусной ДНК было выявлено у 52% животных. Результаты исследования методом РИД были подтверждены в ПЦР. То есть, ПЦР позволила выявить на 36% больше инфицированных животных, чем РИД. Таким образом, ее диагностическая эффективность в 1,63

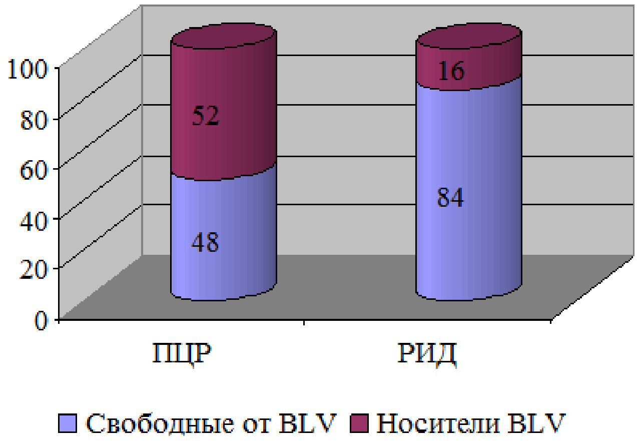

Рис. 4. Результаты обследования КРС методами ПЦР и РИД.

раз выше.

Результаты наших исследований не противоречат данным других авторов. Объясняется это, очевидно, тем, что вирус, локализуясь внутри лейкоцитов в форме провируса, длительное время может находиться в латентном состоянии. Кратковременная виремия при первоначальном заражении не обеспечивает образования достаточных диагностических титров антител. То же явление может наблюдаться и при стойкой иммуносупрессии, вызванной специфическим воздействием данных ретровирусов на факторы иммунитета, в том числе и на отдельные субпопуляции лейкоцитов. Так многими исследователями показано преимущество ПЦР диагностики лейкоза и иммунодефицита КРС по отношению к серологическим методам, таким как иммуноферментный анализ, иммуноблот, реакция иммунофлюоресценции [3, 7, 16, 18].

Заключительным этапом нашей научной работы явилось выяснение информативности ПЦР при исследовании молока и различных фракций крови, полученных от инфицированных лейкозом животных. Для этого методом ПЦР были изучены 271 проба молока от коров, кровь которых уже была нами исследована на наличие провируса лейкоза. Так же методом ПЦР были происследованы сыворотки крови и сгустки, образовавшиеся после ретракции крови от этих животных. При этом сгустки ресуспензировали в забуференном физрастворе (ЗФР), доводя до первоначального объема. В результате, в 141 пробе молока (52%) был обнаружен провирус лейкоза. В 100% случаев наблюдалось совпадение результатов исследования крови и молока. То есть было установлено, что все пробы молока от инфицированных BLV животных оказались положительными. Полученные нами данные можно объяснить тем, что, являясь фильтратом крови, молоко содержит лейкоциты, инфицированные провирусом лейкоза. Результаты наших исследований подтверждают мнение ряда авторов о возможности использования молока в качестве материала для лабораторной диагностики лейкоза [16]. А также для определения пищевой ценности продукта, так как молоко от больных лейкозом коров обладает более низкой пищевой ценностью и содержит вредные для организма человека вещества [2, 23]. Также наблюдалось полное совпадение результатов при исследовании таких фракций крови как сыворотка

и ресуспензированный кровяной сгусток. Данный факт подтверждает, что при помощи ПЦР можно исследовать практически любой биологический материал, с высокой вероятностью обнаружения инфицирующих агентов, вызывающих ретровирусные болезни крупного рогатого скота.

Заключение

Результаты проведённых исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Уровень инфицированности крупного рогатого скота вирусами иммунодефицита и лейкоза в фермерских хозяйствах Саратовской области достаточно высокий: 68,7% и 65,2% соответственно.
2. Сочетанное инфицирование обоими ретровирусами у крупного рогатого скота регистрируется в 52,5% случаев.
3. Степень носительства вируса иммунодефицита КРС в фермерских хозяйствах в 5,55 раз превышает таковую при подворном содержании.
4. Клинические проявления иммунодефицитного состояния, подтвержденные лабораторными исследованиями, наиболее часто регистрируются у КРС в возрасте 5- 10 лет.
5. Молекулярно-генетический метод (ПЦР) для диагностики лейкоза крупного рогатого скота по чувствительности превосходит серологический (РИД) в 1,63 раза.
6. РИД как серологический метод, направленный на обнаружение антител к ретровирусам, не является в полной мере информативными при диагностике лейкоза КРС, по крайней мере, до развития стойкой виремии и накопления высоких диагностических титров антител, а также в период иммуносупрессии.
7. Лабораторная диагностика ретровирусных инфекций КРС должна проводиться комплексно, а отрицательный результат РИД не может являться окончательным при постановке диагноза на лейкоз.
8. Для ПЦР - диагностики лейкоза крупного рогатого скота, возможно использовать такие биологические жидкости организма животного, как молоко и различные фракции крови (сыворотка и кровяной сгусток).
9. Исследование молока методом ПЦР на наличие провируса лейкоза можно применять для определения биологической безопасности данного продукта.

Таким образом, результаты наших исследований показывают широкую распространенность ретровирусных инфекций среди крупного рогатого скота, особенно среди молочных коров фермерских хозяйств. Хотя специфических клинических признаков у инфицированных вирусом иммунодефицита животных не наблюдалось, можно констатировать, что различные патологии инфекционного и неинфекционного характера регистрируются у них довольно часто, что свидетельствует о снижении общей резистентности. Причем частота развития патологий коррелирует с увеличением возраста животных. Данные наших исследований позволяют рекомендовать ПЦР в качестве наиболее специфичного и чувствительного метода при исследовании животных на ретровирусные инфекции, а также при определении молока, полученного от инфицированных животных.

Резюме: Установлено, что уровень инфицированности крупного рогатого скота вирусами иммунодефицита и лейкоза в фермерских хозяйствах Саратовской области достаточно высокий (68,7% и 65,2% соответственно), сочетанное инфицирование обоими ретровирусами регистрируется в 52,5% случаев. Показано, что степень носительства вируса иммунодефицита крупного рогатого скота в фермерских хозяйствах в 5,55 раз превышает таковую при подворном содержании. Выявлено, что клинические проявления иммунодефицитного состояния, подтвержденные лабораторными исследованиями, наиболее часто регистрируются у КРС в возрасте 5- 10 лет. Доказано, что при диагностике лейкоза крупного рогатого скота молекулярно-генетический метод (ПЦР) по чувствительности превосходит серологический (РИД) в 1,63 раза.

SUMMARY

It is established that the infection rate of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in farms of the Saratov region is rather high (68.7% and 65,2%, respectively), the combined infection by both retroviruses is registered in 52,5% of cases. It is shown that the number of carriers of bovine immunodeficiency virus in farms exceeds in 5,55 times the same at personal content. It is revealed that the clinical manifestations of immunodeficiency condition, confirmed by laboratory researches, are the most frequently recorded in cattle aged 5 - 10 years. It is proved that in bovine leukemia diagnostics, the molecular-genetic method (PCR) superior to sensitivity the serological method (RID) in 1.63 times.

Keywords: viral immunodeficiency, leukemia, cattle, polymerase chain reaction, immunodiffusion reaction.

Литература

1. Вирусология Т. 1: Пер. с англ./Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа, при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа. - М.: Мир, 1989. - 492 с.

2. Галеев Р.Ф., Хусаинов Р.Ф. Лейкоз крупного рогатого скота. Уфа: Издательство «Новый стиль». 2009г. - 220 с.

3. Колотвин В.В., Капитонов А.В., Гриненко Н.Ф., и др. Разработка тест-системы ПЦР для индикации вируса бычьего иммунодефицита и выявление ВБИ-инфекции у крупного рогатого скота в России//Доклады РАСХН. - М., -2007. - №1. - С. 4-45.

4. Правила ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов. Утверждены Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 27 декабря 1983 г. по согласованию с Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Министерства здравоохранения СССР. Внесены изменения и дополнения от 17 июня 1988 г.: http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/1107.html

5. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Утверждены департаментом ветеринарии МСХ РФ 23.08.2000г. № 13-7-2/2130.: http://www.lawmix.ru/expertlaw/184424

6. Супотницкий М.В. Эволюционная патология. К вопросу о месте ВИЧ-инфекции и ВИЧ/СПИД-пандемии среди других инфекционных, эпидемических и пандемических процессов. — Москва: Вузовская книга, 2009. - 400 с.

7. Фаизов Т.Х., Усольцев К.В. Разработка тестсистемы для обнаружения участка гена TAX провирусной ДНК лейкоза КРС.//Материалы международной научно-практической конференции «От теории к практике: вопросы современной ветеринарии, битехнологии и медицины».- Саратов, 2011.- С. 332-335.

8. Федоров Ю.Н., Верховский О.А. Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота характеристика и роль в патологии//Ветеринария. 2007. - №1. - С. 18-23.

9. Burkala E.J., Ellis T.M., Voigt V., et al. Serological evidence of an Australian bovine lentivirus. Vet. Microbiol. 1999.; 68:171-177.

10. Del Fava C., Pituco E.M. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. Biológico. 2004; 66:1-8.

11. Gonzalez G.C. Very low prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in western Canadian cattle. Can J Vet Res. 2001 January; 65(1): 73-76.

12. Haghparast A., Mohammadi G., Mousavi S. Seroepidemiology of bovine leukemia virus (BLV) infection in the north eastern provinces of Iran. Faculty of Veterinary medicine, Zagreb Croatian Veterinary Chamber: Zadar, Croatia. In: Harapin I, Kos J, editors. Proceedings of the XVI Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants; Zadar, Croatia. 22-26 April 2008; 2008. p. 504.

13. Meas S., Ohashi K., Tum S., et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. J Vet Med Sci. 2000; 62:779-781.

14. Meas S., Seto J., Sugimoto C. et al. Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. J Vet Med Sci. 2000; 62:329-331.

15. Murakami K., Kobayashi S., Konishi M., et al. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. Vet Microbiol. 2011; 148:84-88.

16. Nash J.W., Hanson L.A., St Cyr Coats K. Detection of bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leukocytes by use of polymerase chain reaction. Am J Vet Res. 1995 Apr; 56(4):445-449.

17. OIE World Organization for Animal Health: http://www.oie.int/

18. Rama G., Moratorio G., Greif G., et al. Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection. Retrovirology. 2011; 8:A17.

19. Rola-Łuszczak M., Kozaczyńska B., Kuźmak J. Serological survey for bovine immunodeficiency virus in dairy cattle from Poland. Pol.J.Vet.Sci. 2011; 14(4):579-83.

20. StCyr Coats K., Pruett S.B., Nash J.W., et al. Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. Vet Microbiol. 1994 Nov; 42(2-3):181-189.

21. Suh G.H., Lee J.C., Lee C.Y., et al. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea. J Vet Sci. 2005; 6:227-230.

22. Tan M.T., Yildirim Y., Erol N., et al. The seroprevalence of bovine herpes virus type 1 (BHV-1) and bovine leukemia virus (BLV) in selected dairy cattle herds in Aydin province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2006; 30:353-357.

23. Trono K.G., Perez-Filgueira D.M., Duffy S., et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. Vet Microbiol. 2001; 83:235-248.

24. Van Leeuwen J.A., Tiwari A., Plaizier J.C., et al. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies partuberculosis, and Neospora caninum in beef and dairy cattle in Manitoba. Can Vet J. 2006; 47:783-786.

Контактная информации об авторах для переписки

Красникова Е.С., Агольцов В.А., Мелкина П.С. - 410012, г. Саратов, Театральная пл.,1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова», krasnikovaes77@yandex.ru